

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 22 DEC 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 58 566.4

Anmeldetag:

15. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber:

P.A.L.M. Microlaser Technologies AG,
82347 Bernried/DE

Bezeichnung:

Haltevorrichtung zum Halten eines Aufnahme-
mittels für ein biologisches Objekt sowie
entsprechendes Verfahren zur Laser-
Mikrodissektion

IPC:

G 01 N, B 01 L

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 04. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer



13842DE HJB/ss

**Haltevorrichtung zum Halten eines Aufnahmemittels für ein biologisches Objekt
sowie entsprechendes Verfahren zur Laser-Mikrodissektion**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Haltevorrichtung zum Halten eines Aufnahmemittels, welches zum Aufnehmen oder Auffangen eines biologischen Objekts vorgesehen ist, in einem Behälter, um beispielsweise eine berührungslose Laser-Mikrodissektion in dem Behälter zu ermöglichen, und ein entsprechendes Verfahren, insbesondere Laser-Mikrodissektionsverfahren.

10

Aus der WO 97/29355 A1 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zur berührungslosen Mikroinjektion und Mikrodissektion, d.h. zur Ernte und zur Gewinnung von biologischen Objekten aus einem umgebenden biologischen Material, mittels Laserbestrahlung bekannt. Dabei wird in dieser Druckschrift vorgeschlagen, das zu bearbeitende biologische Material auf einer Trägerfolie anzuordnen, wobei anschließend mit Hilfe eines Laserstrahls ein zuvor selektiertes biologisches Objekt aus dem umgebenden biologischen Material zusammen mit einem Abschnitt der Trägerfolie ausgeschnitten und durch einen laserinduzierten Transportprozess mittels eines Laserschusses auf ein unmittelbar oberhalb oder unterhalb angeordnetes Auffangsubstrat, beispielsweise in Form einer Kappe eines Mikrozentrifugen- oder Eppendorfbehälters (PCR-Kappe, „Polymerase Chain Reaction“) übertragen wird. Mit Hilfe dieses Laser-Mikrodissektionsverfahrens können aus einer sehr großen Anzahl von biologischen Objekten einzelne ausgewählte biologische Objekte räumlich abgetrennt und ausgesondert werden, wobei dies insbesondere berührungslos erfolgt.

15

20

25

30

Wie bereits zuvor erwähnt worden ist, kann das biologische Material hierzu auf einer Trägerfolie oder Trägermembran angeordnet werden, welche auf einen laserlichtdurchlässigen Glasobjektträger gespannt ist. In der WO 02/14833 A1 der Anmelderin wurde darüber hinaus vorgeschlagen, eine Trägeranordnung mit Haltemitteln zum Halten und Spannen der zuvor genannten Trägermembran, welche laserlichtabsorbierend ist, zu verwenden, wobei die Haltemittel beispielsweise in Form eines umlaufenden Rahmens ausgestaltet sein können. Ebenso wurde in dieser Veröffentlichung vorgeschlagen, eine Trägeranordnung zur verwenden, wobei auf einen Glasobjektträger verzichtet wird und stattdessen eine zusätzliche Membran, welche laserlichtdurchlässig ist, zu verwenden, wobei die la-

serlichtabsorbierende Membran unmittelbar auf der laserlichtdurchlässigen Membran angeordnet wird. Die genannte Trägeranordnung kann dabei in einem Behälter in Form einer Petrischale derart integriert sein, dass die beiden aneinander angrenzenden Membrane an der Unterseite des Grundkörpers der Petrischale planar eingespannt sind. Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, dass einerseits in der Petrischale lebende Zellkulturen gezüchtet werden können und andererseits in der Petrischale befindliche biologische Objekte unmittelbar dem zuvor beschriebenen Laser-Mikrodissektionsverfahren unterzogen werden können, um die selektierten biologischen Objekte aus dem umgebenden biologischen Material zu separieren, ohne dass hierzu die Zellkulturen aus der Petrischale entnommen und auf einen herkömmlichen Objektträger aufgebracht werden müssen.

Dennoch ist auch bei der zuvor beschriebenen Anordnung zur Laser-Mikrodissektion ein Öffnen der Petrischale erforderlich, um die selektierten biologischen Objekte aus der Petrischale heraus zu dem gewünschten Auffangbehälter befördern zu können. Dies erfordert nicht nur einen erhöhten Aufwand, sondern es können Verunreinigungen verschiedenster Art in die Petrischale gelangen, welche die Eigenschaften des darin befindlichen biologischen Materials negativ beeinflussen können. Darüber hinaus ist bei der zuvor beschriebenen Vorgehensweise ein Arbeiten in einer vollkommen sterilen Umgebung nicht möglich, da nicht nur für den Laser-Mikrodissektionsvorgang die Petrischale geöffnet werden muss, sondern auch anschließend der Auffangbehälter mit dem dort hinein katapultierten biologischen Objekt in einer nicht sterilen Umgebung in dem jeweiligen Laser-Mikrodissektionssystem gehalten wird.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Haltevorrichtung zum Halten eines zum Aufnehmen eines biologischen Objekts vorgesehenen Aufnahmemittels in einem geschlossenen Behälter, beispielsweise einer Petrischale der zuvor beschriebenen Art, bereitzustellen, mit deren Hilfe die oben erwähnten Nachteile vermieden werden und insbesondere eine Laser-Mikrodissektion in dem jeweiligen Behälter unter vollkommen sterilen Bedingungen möglich ist. Darüber hinaus liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein entsprechendes Verfahren zum Halten eines derartigen Aufnahmemittels in einem derartigen Behälter und ein entsprechendes Verfahren zur Laser-Mikrodissektion von biologischen Objekten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Haltevorrichtung mit den Merkmalen des Anspruches 1 bzw. ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruches 18 und ein Verfahren zur Laser-Mikrodissektion mit den Merkmalen des Anspruches 24 gelöst. Die Unter-

ansprüche definieren jeweils bevorzugte und vorteilhafte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäße Haltevorrichtung dient zum Halten eines Aufnahmemittels, beispielsweise in Form einer Kappe eines Mikrozentrifugenröhrchens, oder mehrerer Aufnahmemittel in einem geschlossenen Behälter, beispielsweise in Form einer Petrischale. Dabei umfasst die Haltevorrichtung einen extern von dem Behälter anzuordnenden Halteabschnitt und einen in dem Behälter anzuordnenden Auffangabschnitt, welcher das mindestens eine Aufnahmemittel zum Aufnehmen eines oder mehrerer biologischer Objekte innerhalb des geschlossenen Behälters hält. Dabei kann es sich insbesondere um ein Aufnahmemittel in Form eines Auffangbehälters zum Auffangen eines mittels Laser-Mikrodissektion aus einem in dem Behälter befindlichen biologischen Material gewonnenen biologischen Objekts handeln. Der extern von dem Behälter anzuordnende Halteabschnitt und der in dem Behälter anzuordnende Aufnahmeabschnitt sind berührungslos derart gekoppelt, dass mit Hilfe des Halteabschnitts der Aufnahmeabschnitt in dem geschlossenen Behälter positionierbar ist.

Bei der berührungslosen Kopplung zwischen dem Halteabschnitt und dem Aufnahmeabschnitt kann es sich insbesondere um eine magnetische Kopplung handeln, wobei auch andere berührungslose Kopplungsarten, beispielsweise durch elektrostatische Aufladung etc., möglich sind.

Wie bereits beschrieben worden ist, kann es sich bei dem oben genannten Behälter um eine Petrischale handeln, wobei an der Unterseite des Behälters eine laserlichtdurchlässige Membran als Stützmembran und eine laserlichtabsorbierende Membran als Trägermembran für das darauf befindliche biologische Material gespannt sind. Auf diese Weise können selektierte biologische Objekte mit Hilfe eines geeigneten Laser-Mikrodissektionssystems unmittelbar in dem Behälter von dem umgebenden biologischen Material separiert und zu dem von dem Aufnahmeabschnitt in dem Behälter gehaltene Aufnahmemittel laserinduziert transportiert werden. Ein Öffnen des Behälters ist für den Laser-Mikrodissektionsvorgang nicht erforderlich.

Die Erfindung ermöglicht insbesondere die vollkommen sterile Ernte bzw. Separation von biologischen Objekten in dem genannten Behälter. Hierzu muss der Aufnahmeabschnitt lediglich sterilisiert und unter sterilen Bedingungen in dem Behälter angeordnet werden. Dies kann dadurch erfolgen, dass eine Abdeckung des Behälters auf dem Aufnahmeab-

schnitt platziert und anschließend auf der Abdeckung der Halteabschnitt angeordnet wird. Anschließend kann die gesamte Anordnung auf bzw. in dem Behälter angeordnet werden, so dass der Aufnahmeabschnitt in dem Behälter zu liegen kommt, während der Halteabschnitt außerhalb des Behälters den Aufnahmeabschnitt in dem Behälter positioniert.

5 Durch Bewegen des Halteabschnitts kann das Aufnahmemittel beliebig in dem Behälter positioniert werden.

Der in dem Behälter anzuordnende Aufnahmeabschnitt ist vorzugsweise aus einem biologisch verträglichen Material gefertigt, d.h. aus einem Material, welches die biologischen Eigenschaften des in dem Behälter befindlichen biologischen Materials nicht negativ beeinträchtigt. So kann beispielsweise der Aufnahmeabschnitt aus Polyfluortetraethylen gefertigt sein. Auch der Halteabschnitt kann aus diesem Material bestehen. Allgemein sind für beide Abschnitte Kunststoffmaterialien möglich.

Zum Positionieren des Halteabschnitts kann dieser mit einem Hebel, einem Stab, einem Arm oder dergleichen versehen sein, so dass ein Benutzer einfach den Halteabschnitt und den damit gekoppelten Aufnahmeabschnitt manuell verschieben kann. Ebenso ist in einem Laser-Mikrodissektionssystem ein rechnergestütztes Positionieren des Aufnahmeabschnitts durch rechnergestütztes Verstellen des Halteabschnitts möglich.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend näher unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele erläutert.

Fig. 1A und Fig. 1B zeigen eine Seitenansicht bzw. eine Draufsicht auf einen Halteabschnitt einer Haltevorrichtung gemäß einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung.

Fig. 2A – Fig. 2C zeigen eine Seitenansicht, eine Draufsicht von oben und eine Draufsicht von unten auf einen Aufnahmeabschnitt der erfindungsgemäßen Haltevorrichtung.

Fig. 3 zeigt eine Querschnittsansicht einer Petrischale mit der erfindungsgemäßen Haltevorrichtung, wobei der in Fig. 1 gezeigte Halteabschnitt extern von der Petrischale und der in Fig. 2 gezeigte Aufnahmeabschnitt in der Petrischale angeordnet ist, und

Fig. 4 zeigt ein Laser-Mikrodissektionssystem, bei dem die vorliegende Erfindung zum Einsatz kommen kann.

Bevor die Einzelheiten der erfindungsgemäßen Haltevorrichtung näher erläutert werden, sollen nachfolgend kurz die Grundlagen der Laser-Mikrodissektion anhand des in Fig. 4 gezeigten Laser-Mikrodissektionssystems erläutert werden.

Das in Fig. 4 gezeigte Laser-Mikrodissektionssystem 20 umfasst als wesentlichen Bestandteil eine Laservorrichtung 22, in der eine Laserlichtquelle, beispielsweise ein UV-Laser, zur Erzeugung eines Laserstrahls untergebracht ist. Des Weiteren ist in der Laservorrichtung 22 Optik 31 untergebracht, die erforderlich ist, um den Laserstrahl in ein Mikroskop 21 einzukoppeln und den Laserfokus in der Objektebene auf den optischen Fokus des Mikroskops 21 abzustimmen. Mit Hilfe eines Neutralfilters 32, welcher senkrecht zum Laserstrahlpfad angeordnet ist, kann die effektive Laserenergie eingestellt werden. Der über ein Objektiv 30 emittierte Laserstrahl trifft auf einen motorisierten und computergesteuerten Mikroskop- oder Trägertisch 28, auf dem ein Träger mit einem zu bearbeitenden biologischen Material angeordnet werden kann. Oberhalb des Trägertisches 28 befindet sich ein manuell betätigbarer oder vorzugsweise ebenfalls motorisierter und computersteuerter Manipulator 29.

Der Trägertisch 28 ist vorzugsweise in x- und y-Richtung verfahrbar, während der Manipulator 29 zudem in z-Richtung positioniert werden kann. An dem Manipulator 29 kann beispielsweise eine Nadel oder Mikropipette zur Mikroinjektion angebracht sein. Zur Laser-Mikrodissektion hält der Manipulator 29 üblicherweise einen oder mehrere Auffangbehälter, wobei der jeweilige Auffangbehälter über den Laserstrahl zu positionieren ist, so dass anschließend durch Laserbestrahlung von dem Trägertisch 28 mit dem Laserstrahl bestrahlte biologische Objekte zu dem Auffangbehälter katapultiert und dort aufgefangen werden können.

Bei dem Mikroskop 21 kann es sich um ein beliebig ausgestaltetes Mikroskop handeln. Insbesondere ist sowohl die Verwendung eines inversen Mikroskops, wie es in Fig. 4 gezeigt ist, als auch eines aufrechten Mikroskops oder eines Lasermikroskops denkbar. Das Mikroskop 21 ist mit einer Videokamera, insbesondere einer CCD-Videokamera („Charge Coupled Device“), ausgestattet, die den Bereich des Trägertisches 28 oberhalb des Objektivs 30 aufnimmt. Das Videosignal dieser Videokamera wird einem handelsüblichen Computer 24 zugeführt, so dass das entsprechende Videobild in Echtzeit auf dem Bildschirm oder Monitor 23 des Computers 24 dargestellt werden kann. Die von dem Computer 24 zur Laser-Mikrodissektion zur Verfügung gestellten Funktionen können über eine Tastatur 26 oder eine Computermouse 27 gesteuert werden. Des Weiteren ist gemäß Fig.

4 ein Fußschalter 25 vorgesehen, durch dessen Betätigung der Laser manuell aktiviert werden kann.

Der in Fig. 4 gezeigte Manipulator 29 ist zum Halten von Auffangbehältern, wie beispielsweise Kappen von Mikrozentrifugenbehältern oder Mikrotiterplatten etc., erforderlich, wenn biologische Objekte von dem Trägertisch 28 zu dem jeweiligen Auffangbehälter
5 wegbefördert werden sollen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird jedoch eine Möglichkeit bereitgestellt, innerhalb eines geschlossenen Behälters dissektieren zu können, so dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung der Manipulator 29 an sich nicht erforderlich ist.

Stattdessen wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon ausgegangen, dass zum Halten des Auffangbehälters bzw. Aufnahmebehälters eine Haltevorrichtung zum Einsatz kommt, die ein berührungsloses Halten des Auffangbehälters in einem geschlossenen Behälter ermöglicht. Diese Haltevorrichtung umfasst einen Halteabschnitt, der in Fig. 1A und Fig. 1B in Form eines bevorzugten Ausführungsbeispiels dargestellt ist, und einen
15 Aufnahmeabschnitt zum Aufnehmen mindestens eines Auffangbehälters, wie er in Fig. 2A - Fig. 2C in Form eines bevorzugten Ausführungsbeispiels dargestellt ist.

Der Halteabschnitt 1 besitzt eine im Wesentlichen halbkreisförmige Scheibenform mit einer Einbuchtung. An der Unterseite des Halteabschnitts 1 sind mehrere Magnete 3 in Vertiefungen angeordnet. Von der Seite des Halteabschnitts 1 erstreckt sich ein Arm oder Halter 2, mit dessen Hilfe ein Benutzer den Halteabschnitt 1 exakt positionieren kann.
20

Der Aufnahmeabschnitt weist eine obere Hälfte 5 auf, welche im Wesentlichen wie der Halteabschnitt 1 geformt ist. An der Oberseite dieser oberen Hälfte 5 sind in entsprechenden Vertiefungen Magnete 7 angeordnet, welche mit den Magneten 3 des Halteabschnitts 1 zusammenwirken. Die untere Hälfte 6 des Aufnahmeabschnitts 4 ist im Wesentlichen
25 kreisförmig ausgebildet und besitzt ein Durchgangsloch 8, in welches als Auffangbehälter eine PCR-Kappe eines Mikrozentrifugenröhrchens eingesetzt werden kann.

Die zuvor beschriebene Haltevorrichtung dient zur Separation bzw. Ernte von biologischen Objekten einschließlich lebender Zellen in den Auffangbehälter unter reinen Bedingungen, d.h. unter sterilen Bedingungen, in einem geschlossenen Behälter. Dabei ist die Haltevorrichtung derart ausgestaltet, dass durch den nicht sterilen Halteabschnitt 1 der
30 sterile Aufnahmeabschnitt 4 im Inneren des jeweiligen Behälters derart gehalten wird, dass die Halterung fest genug erfolgt, so dass während eines Transportes des Behälters

mit der Haltevorrichtung ein sicherer Transport gewährleistet ist. Darüber hinaus ist die Haltevorrichtung derart ausgestaltet, dass durch Drehen oder Bewegen des Halteabschnitts 1 von außen der in dem Behälter befindliche Aufnahmeabschnitt 4 mit dem Auffangbehälter bzw. den Auffangbehältern bewegt werden kann, um einen hohen Flächenanteil des Bodens des Behälters bei einem nachfolgenden Laser-Mikrodissektionsprozess, beispielsweise zur Zellernte, abdecken zu können. Die Kraftübertragung vom unsterilen Halteabschnitt 1 auf den sterilen Aufnahmeabschnitt 3 der Haltevorrichtung erfolgt berührungslos, d.h. kontaktfrei, vorzugsweise mit Hilfe der in Fig. 1 und Fig. 2 gezeigten Magnete 3, 7, wobei selbstverständlich eine ausreichende Halterung auch bereits durch die Verwendung von jeweils einem Magneten in dem Halteabschnitt 1 und dem Aufnahmeabschnitt 4 gewährleistet sein kann. Schließlich ist die Haltevorrichtung auch derart ausgestaltet, dass der im Behälter mit dem biologischen Material befindliche Aufnahmeabschnitt 4 biologisch verträglich ist bzw. biologisch verträglich hergerichtet werden kann, z.B. durch Sterilisation, Autoklavieren oder derartige Prozesse. Ein geeignetes und biologisch verträgliches Material für den Aufnahmeabschnitt 4 (und den Halteabschnitt 1) ist beispielsweise Polyfluortetraethylen (PFTE). Das jeweils gewählte Material und die Magnete 7 sind vorzugsweise zu versiegeln.

Die Haltevorrichtung kann vorzugsweise auch derart ausgestaltet sein, dass (nicht gezeigte) Beleuchtungsmittel integriert sind oder dass eine möglichst gute Beleuchtung der Probe durch die Beleuchtung des entsprechenden Laser-Mikrodissektionssystems möglich ist. Dies ist bei dem dargestellten Ausführungsbeispiel insbesondere durch die sowohl im Halteabschnitt 1 als auch im Aufnahmeabschnitt 4 ausgebildete Einbuchtung für den Strahlengang, durch die zumindest zu einer Seite hin offene Form der Haltevorrichtung und die Tatsache, dass das Durchgangsloch 8 nicht verdeckt und auch von oben und von der Seite gut einsehbar und zugänglich ist, erzielt.

Fig. 3 zeigt die Verwendung der zuvor beschriebenen Haltevorrichtung mit einem geschlossenen Behälter in Form einer Petrischale, welche einen im Wesentlichen zylinderförmigen lichtdurchlässigen Grundkörper 10 und eine ebenfalls lichtdurchlässige kreisrunde Abdeckung 11 umfasst. Die Oberseite des Grundkörpers 10 ist offen, während die Unterseite von einer ersten Membran 13 abgedeckt ist. Diese Membran 13 kann beispielsweise ebenfalls aus Polyfluortetraethylen (Handelsname Teflon®) bestehen und eine Dicke von ca. 20-25 µm aufweisen. Die Membran 13 ist an der Unterseite des Grundkörpers 10 mit Hilfe eines umlaufenden kreisförmigen Rings 12 zwischen dem Ring 12 und dem Grundkörper 10 eingespannt und planar. Unmittelbar auf dieser Membran 13, welche la-

serlichtdurchlässig ist, ist eine weitere Membran 14 angeordnet, die derart ausgestaltet ist, dass sie mittels Laserstrahlung geschnitten werden kann bzw. biologische Objekte von ihr mit Hilfe des zuvor beschriebenen Laser-Mikrodissektionsvorgangs wegkatapultiert werden können. Die Membran 14 ist demzufolge laserlichtabsorbierend ausgestaltet. Die
 5 laserlichtabsorbierende Membran 14 und die laserlichtdurchlässige Membran 13 sind beide zwischen dem Ring 12 und dem Grundkörper 10 der Petrischale derart eingespannt, dass sich eine planare Oberfläche ergibt. Die beiden Membrane 13 und 14 können gegebenenfalls aneinander geklebt sein oder aneinander haften.

Auf der laserlichtabsorbierenden Membran 14 ist ein zu bearbeitendes biologisches Material 15 aufgetragen. Die Ausgestaltung der Petrischale gemäß Fig. 3 ist insbesondere deshalb vorteilhaft, da in der Petrischale Zellkulturen gezüchtet werden können, welche anschließend unmittelbar einer Laserbestrahlung zum Separieren einzelner biologischer
 10 Objekte aus dem biologischen Material 15 unterzogen werden können, ohne die Zellkulturen aus der Petrischale entnehmen und auf einem herkömmlichen Objektträger aufbringen zu müssen.

In Fig. 3 ist als Aufnahme- bzw. Auffangbehälter 9 eine Kappe eines Mikrozentrifugenröhrchens dargestellt, welche von dem Aufnahmeabschnitt 4 der zuvor beschriebenen Haltevorrichtung in der Petrischale gehalten wird. Zum Anordnen dieser Kappe 9 in der
 20 Petrischale muss zunächst die Kappe an einem sterilen Arbeitsplatz in den sterilen Aufnahmeabschnitt 4 eingesetzt werden. Anschließend wird die Abdeckung 11 der Petrischale auf den Aufnahmeabschnitt 4 mit der davon gehaltenen Kappe 9 angeordnet. Gegenüberliegend oder in der Nähe zu dem Aufnahmeabschnitt 4 wird dann auf die Abdeckung 11 der Halteabschnitt 1 derart platziert, dass die Magneten 3 und 7 des Halteabschnitts 1 bzw. des Aufnahmeabschnitts 4 eine magnetische Kopplung bewerkstelligen können.

Anschließend wird die somit gebildete Anordnung auf den Grundkörper 10 der Petrischale derart gesetzt, dass der Aufnahmeabschnitt 4 mit der davon gehaltenen Kappe 9 im Inneren der Petrischale angeordnet ist, während der Halteabschnitt 1 auf der Abdeckung 11 extern von der Petrischale angeordnet ist. Die somit vorbereitete Petrischale kann mit der Haltevorrichtung anschließend zu einem Laser-Mikrodissektionssystem, beispielsweise
 30 einem Laser-Mikrodissektionssystem der in Fig. 4 gezeigten Art, transportiert oder getragen werden, um das im Inneren der Petrischale befindliche biologische Material einem Laser-Mikrodissektionsprozess zu unterziehen.

Dabei ist die Petrischale mit dem darin befindlichen biologischen Material oberhalb des Laserstrahls des Laser-Mikrodissektionssystems derart zu positionieren, dass der Laserstrahl von unten auf die Petrischale trifft und die laserlichtdurchlässige Membran 13, welche als Boden bzw. Stütze für die wesentlich dünnere laserlichtabsorbierende Membran 14 dient, durchwandert. Mit Hilfe einer Relativbewegung zwischen der Petrischale und dem Laserstrahl kann die laserlichtabsorbierende Membran 14 mit dem darauf befindlichen biologischen Material geschnitten werden, um einzelne zuvor selektierte biologische Objekte aus dem umgebenden biologischen Material herauszuschneiden. Wurden auf diese Weise die gewünschten biologischen Objekte separiert, kann mit Hilfe eines einzelnen Laserschusses oder einzelner Laserschüsse das jeweils gewünschte biologische Objekt mit dem entsprechenden herausgeschnittenen Membrananteil der laserlichtabsorbierenden Membran 14 nach oben in die Kappe 9 katapultiert werden, wobei das jeweilige biologische Objekt an der Unterseite der Kappe 9 haften bleibt.

Wie bereits erwähnt worden ist, ist die laserlichtabsorbierende Membran 14 wesentlich dünner als die als Stütze dienende laserlichtdurchlässige Membran 13 und kann beispielsweise aus Polyester mit einer Dicke von $0,9 \mu\text{m} - 1 \mu\text{m}$ oder Polyethylen-Naphthalin mit einer Dicke von ca. $1,35 \mu\text{m}$ bestehen. Eine Polyethylen-Naphthalin-Membran ist beispielsweise zur Laserbehandlung von Zellgewebe vorteilhaft, da sie sich mit relativ geringer Laserenergie sehr gut schneiden lässt. Dagegen ist eine Polyester-Membran von Vorteil, wenn eng beieinander liegende biologische Objekte, wie beispielsweise Chromosomen oder Filamente, aus dem umgebenden biologischen Material 15 herausgelöst werden sollen, da hierfür für eine Probengewinnung häufig zunächst eine selektive Ablation des umliegenden biologischen Materials erforderlich ist, was bei Anwendung einer Polyester-Membran ohne Zerstörung der Membran möglich ist.

Die Haltevorrichtung ist vorzugsweise derart ausgestaltet, dass die Probe, d.h. das biologische Material 15, bei Einsatz in einem Laser-Mikrodissektionssystem möglichst gut beleuchtet wird bzw. eine möglichst gute Beleuchtung der Probe gewährleistet bleibt. Dies ist bei dem in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiel durch die spezielle Form des Aufnahmeabschnitts 4 und des Halteabschnitts 1 sichergestellt. Dies kann auch durch Verwendung eines lichtdurchlässigen Materials für den Halteabschnitt 1 und den Aufnahmeabschnitt 4 unterstützt werden.

Selbstverständlich ist die zuvor beschriebene Haltevorrichtung nicht auf das Halten einer Kappe 9 als Auffangbehälter und auch nicht auf das Halten lediglich eines Auffangbehäl-

ters beschränkt. Die Haltevorrichtung kann ohne Weiteres auch derart konstruiert werden, dass mehrere Aufnahme- bzw. Auffangbehälter gehalten werden können. Darüber hinaus ist die Haltevorrichtung auch nicht auf den Einsatz in Petrischalen beschränkt, sondern sie kann generell zusammen mit geschlossenen Behältern verwendet werden, in denen ein
5 oder mehrere Träger mit biologischen Materialien angeordnet sind.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass eine Laser-Mikrodissektion des in dem geschlossenen Behälter befindlichen biologischen Materials vollständig unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden kann, ohne dass hierzu der Behälter geöffnet werden muss. Mit Hilfe der Erfindung ist der Transport des Behälters
10 zusammen mit der Haltevorrichtung und dem davon in dem Behälter gehaltenen Aufnahme- oder Auffangbehälter aus einer entsprechenden Umgebung oder einem entsprechenden Arbeitsplatz, beispielsweise einer sterilen biochemischen Werkbank, zu einem davon entfernt stehenden Laser-Mikrodissektionssystem möglich, wobei während des Transports der Behälter geschlossen bleiben kann.

15 Zudem kann mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ein Behälter auch zum Bearbeiten mit infektiösem biologischem Material, beispielsweise mit Viren etc., verwendet werden. Hierzu können membranbespannte Behälter erstellt werden, in denen ein oder mehrere Objektträger aufgenommen werden können. Darüber befindet sich eine Abdeckung bzw. ein Deckel, wobei mit Hilfe der erfindungsgemäßen Haltevorrichtung ein oder mehrere Auf-
20 fangbehälter über den Laserstrahl des entsprechenden Laser-Mikrodissektionssystems bewegt werden können, ohne den Behälter für die Laser-Mikrodissektion öffnen zu müssen. Die Bestückung des Behälters mit den Objektträgern oder deren Entnahme aus dem Behälter wird dann vorzugsweise an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, wobei während des Arbeitens an dem Laser-Mikrodissektionssystem oder während eines Arbeitens
25 an einem Mikroskop ein zusätzliches Versiegeln des Behälters beispielsweise mit einem Klebestreifen etc. empfehlenswert sein kann.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass eine Kombination der zuvor beschriebenen Haltevorrichtung mit einem computergesteuerten Laser-Mikrodissektionssystem auch derart möglich sein kann, dass der Halteabschnitt 1 der Haltevorrichtung bzw. der daran
30 angebrachte Arm 2 von dem Laser-Mikrodissektionssystem computergesteuert automatisch positioniert wird, um beispielsweise rechnergestützt selektierte biologische Objekte des in dem Behälter befindlichen biologischen Materials 15 nacheinander in ebenfalls zuvor selektierte Auffangbehälter 9, welche von der Haltevorrichtung in dem Behälter

gehalten werden, zu befördern. Hierzu kann beispielsweise eine entsprechende Kopplung zwischen dem Arm 2 des Halteabschnitts 1 und dem in Fig. 4 gezeigten Manipulator 29 des entsprechenden Laser-Mikrodissektionssystems vorgesehen sein, so dass die zuvor selektierten Auffangbehälter 9 nacheinander über die gewünschten biologischen Objekte des biologischen Materials 15 bewegt werden können. Andererseits erfolgt die zur Laser-Mikrodissektion erforderliche Relativbewegung zwischen dem biologischen Material 15 und dem Laserstrahl der Laservorrichtung, 20 über den Trägertisch 28 des Laser-Mikrodissektionssystems, so dass nacheinander die gewünschten biologischen Objekte des biologischen Materials 15 über den Laserstrahl der Laservorrichtung 22 bewegt werden.

Die erfindungsgemäße Haltevorrichtung eignet sich nicht nur zur Laser-Mikrodissektion, sondern allgemein zum Halten eines Aufnahmemittels für ein biologisches Objekt in einem Behälter, um beispielsweise mit Hilfe eines Mikroskopsystems das in dem jeweiligen Aufnahmemittel befindliche biologische Objekt zu beobachten, zu untersuchen oder zu bearbeiten oder dergleichen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Haltevorrichtung zum Halten mindestens eines zum Aufnehmen eines biologischen Objekts vorgesehenen Aufnahmemittels (9) in einem Behälter (10, 11),
mit einem extern von dem Behälter (10, 11) anzuordnenden Halteabschnitt (1),
und
mit einem in dem Behälter (10, 11) anzuordnenden Aufnahmeabschnitt (4), welcher zum Halten des mindestens einen Aufnahmemittels (9) ausgestaltet ist, wobei der Halteabschnitt (1) und der Aufnahmeabschnitt (4) berührungslos derart gekoppelt sind, dass über den Halteabschnitt (1) der Aufnahmeabschnitt (4) in dem Behälter (10, 11) positionierbar ist.
2. Haltevorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Aufnahmeabschnitt (4) zum Halten des mindestens einen als Auffangbehälter zum Auffangen eines mittels Laser-Mikrodissektion aus einem in dem Behälter (10, 11) anzuordnenden biologischen Material (15) gewonnenen biologischen Objekts ausgestalteten Aufnahmemittels (9) ausgestaltet ist.
3. Haltevorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Haltevorrichtung mit dem Halteabschnitt (1) und dem Aufnahmeabschnitt (4) zur Durchführung von Laser-Mikrodissektion in dem geschlossenen Behälter (10, 11) bezüglich eines in dem geschlossenen Behälter (10, 11) anzuordnenden biologischen Materials (15) ausgestaltet ist.
4. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Aufnahmeabschnitt (4) zum Halten mindestens eines kappenartigen Aufnahmemittels (9) zum Aufnehmen eines biologischen Objekts in dem Behälter (10, 11) ausgestaltet ist.
5. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

dass der Aufnahmeabschnitt (4) zum Halten mehrerer Aufnahmemittel (9) in dem Behälter (10, 11) ausgestaltet ist.

- 5 6. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der in dem Behälter (10, 11) anzuordnende Aufnahmeabschnitt (4) aus einem Material gefertigt ist, welches die biologischen Eigenschaften eines von dem mindestens einen Aufnahmemittel (9), welches von dem Aufnahmeabschnitt (4) in dem Behälter (10, 11) gehalten wird, aufgenommenen biologischen Objekts nicht beeinträchtigt.
7. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Halteabschnitt (1) und der Aufnahmeabschnitt (4) aus einem Kunststoffmaterial gefertigt sind.
- 15 8. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Aufnahmeabschnitt (4) aus Polyfluortetraethylen gefertigt ist.
9. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Halteabschnitt (1) aus Polyfluortetraethylen gefertigt ist.
10. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Halteabschnitt (1) mit dem Aufnahmeabschnitt (4) berührungslos durch eine Magnetkopplung (3, 7) gekoppelt ist.
- 25 11. Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Haltevorrichtung derart ausgestaltet ist, dass sie eine gute Beleuchtung eines in dem Behälter (10, 11) befindlichen biologischen Materials (15) und/oder eine gute Beleuchtung des in dem Aufnahmemittel (9) aufgenommenen biologischen Objekts ermöglicht.

12. Kombination aus einem Behälter (10, 11) und einer Haltevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Halten mindestens eines zum Aufnehmen eines biologischen Objekts in dem Behälter (10, 11) vorgesehenen Aufnahmemittels (9) in dem Behälter (10, 11).
- 5 13. Kombination nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter die Form einer Petrischale besitzt.
- 10 14. Kombination nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter einen Grundkörper (10) mit einer Bodenfläche für ein biologisches Material (15) und einer Abdeckung (11) zum Abdecken und Verschließen des Grundkörpers (10) umfasst.
- 15 15. Kombination nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Bodenfläche des Grundkörpers (10) eine erste Membran (13), welche laserlichtdurchlässig ist, und eine auf der ersten Membran (13) angeordnete zweite Membran (14), welche laserlichtdurchlässig ist, umfasst.
16. Laser-Mikrodissektionssystem (20) mit einer Haltevorrichtung nach einem der Ansprüche 1-12.
- 20 17. Laser-Mikrodissektionssystem nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Laser-Mikrodissektionssystem (20) zum rechnergestützten Positionieren des Aufnahmeabschnitts (4) in dem Behälter (10, 11) durch rechnergestütztes Verstellen des Halteabschnitts (1) der Haltevorrichtung ausgestaltet ist.
- 25 18. Verfahren zum Halten mindestens eines Aufnahmemittels (9), welches zum Aufnehmen eines biologischen Objekts vorgesehen ist, in einem Behälter (10, 11), umfassend die Schritte
- 30 a) Anordnen eines Aufnahmeabschnitts (4), welcher zum Halten des mindestens einen Aufnahmemittels (9) ausgestaltet ist, in dem Behälter (10, 11),
b) Anordnen eines Halteabschnitts (1) extern von dem Behälter (10, 11), und
c) Positionieren des Aufnahmeabschnitts (4) in dem Behälter (10, 11) durch Be-

wegen des Halteabschnitts (1) mit Hilfe einer berührungslosen Kopplung zwischen dem Halteabschnitt (1) und dem Aufnahmeabschnitt (4).

19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass im Schritt b) der Halteabschnitt (1) extern von dem Behälter (10, 11) in der Nähe des in dem Behälter (10, 11) befindlichen Aufnahmeabschnitts (4) angeordnet wird.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass im Schritt a) der Aufnahmeabschnitt (4) auf einer Innenseite einer Abdeckung (11) des Behälters angeordnet wird, und
dass im Schritt b) der Halteabschnitt (1) auf einer Außenseite der Abdeckung (11) angeordnet wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass nach dem Anordnen des Aufnahmeabschnitts (4) auf der Innenseite der Abdeckung (11) und des Halteabschnitts (1) auf der Außenseite der Abdeckung (11) die Anordnung aus dem Halteabschnitt (1), der Abdeckung (11) und dem Aufnahmeabschnitt (4) derart mit einem Grundkörper (10) des Behälters kombiniert wird,
20 dass die Abdeckung (11) den Grundkörper (10) abdeckt und der Aufnahmeabschnitt (4) an der Innenseite der Abdeckung (11) im Inneren des durch den Grundkörper (10) und die Abdeckung (11) gebildeten Behälters angeordnet ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-21,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass vor Durchführung des Schritts a) der Aufnahmeabschnitt (4) sterilisiert wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-22,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Halteabschnitt (1) und der Aufnahmeabschnitt (4) eine Haltevorrichtung nach einem der Ansprüche 1-11 bilden.
- 30 24. Verfahren zur Laser-Mikrodissektion in einem Behälter (10, 11),
dadurch gekennzeichnet,

dass mindestens ein Aufnahmemittel (9) zum Aufnehmen eines mittels Laser-Mikrodissektion aus einem in dem Behälter (10, 11) befindlichen biologischen Material (5) herausgelösten biologischen Objekts mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 18-23 in dem Behälter (10, 11) gehalten wird, und

5 dass durch Laser-Mikrodissektion aus dem in dem Behälter (10, 11) befindlichen biologischen Material (15) das mindestens eine biologische Objekt herausgelöst und von dem mindestens einem in dem Behälter (10, 11) gehaltenen Aufnahmemittel (9) aufgenommen wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren rechnergestützt durchgeführt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass zur Durchführung des Verfahrens eine Haltevorrichtung gemäß einem der
15 Ansprüche 1-11 zum Halten des mindestens einen Aufnahmemittels (9) in dem Behälter (10, 11) verwendet wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24-26,
dadurch gekennzeichnet,
dass zur Durchführung der Laser-Mikrodissektion eine Kombination aus dem ge-
20 schlossenen Behälter (10, 11) und einer Haltevorrichtung (1, 4) nach einem der Ansprüche 12-17 verwendet wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Ermöglichung einer berührungslosen Laser-Mikrodissektion in einem geschlossenen Behälter (10, 11), beispielsweise in Form einer Petrischale, wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, eine Haltevorrichtung zu verwenden, welche einen in dem Behälter (10, 11) anzuordnenden Aufnahmeabschnitt (4) und einen extern von dem Behälter (10, 11) anzuordnenden Halteabschnitt (1) umfasst. Der Aufnahmeabschnitt (4) dient zur Aufnahme mindestens eines Aufnahmemittels (9), welches wiederum zum Aufnehmen oder Auffangen mindestens eines durch Laser-Mikrodissektion aus einem in dem Behälter (10, 11) befindlichen biologischen Material (15) gewonnenen biologischen Objekts dient. Der Halteabschnitt (1) ist mit dem Aufnahmeabschnitt (4) berührungslos, beispielsweise mittels Magnetkopplung, derart gekoppelt, dass durch Bewegen des Halteabschnitts (1) der Aufnahmeabschnitt (4) in dem geschlossenen Behälter (10, 11) mit dem davon gehaltenen Aufnahmemittel (9) exakt über das jeweils aufzunehmende biologische Objekt positioniert werden kann.

15 (Fig. 3)

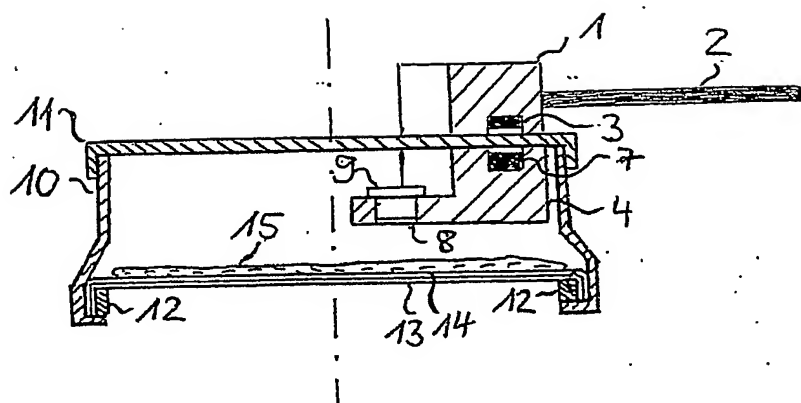


FIG. 3

BEST AVAILABLE COPY

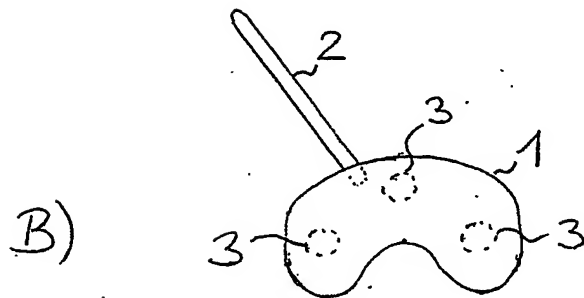
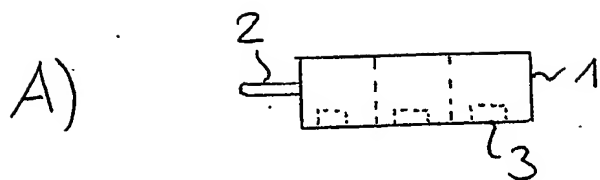


FIG. 1

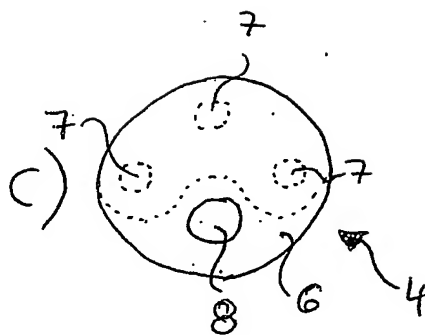
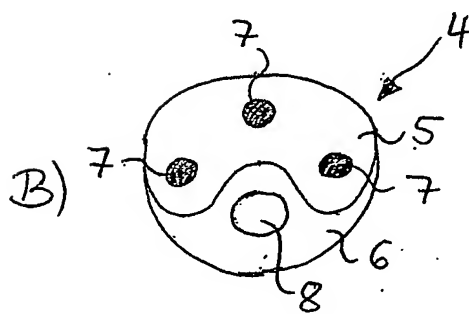
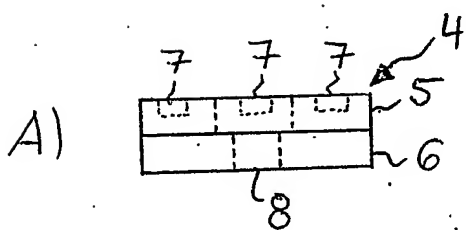


FIG. 2

BEST AVAILABLE COPY

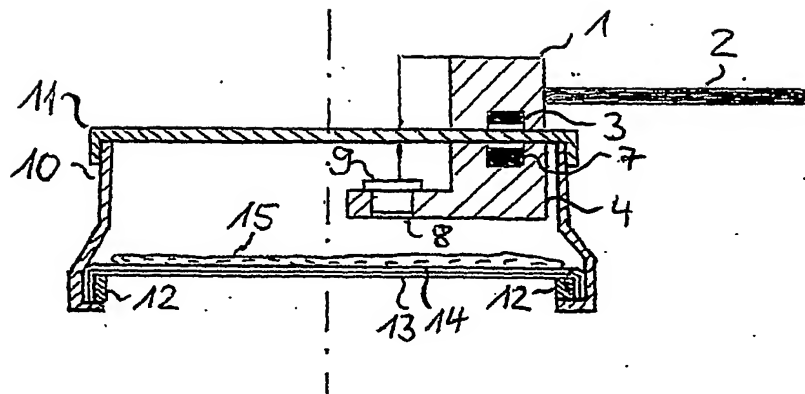


FIG. 3

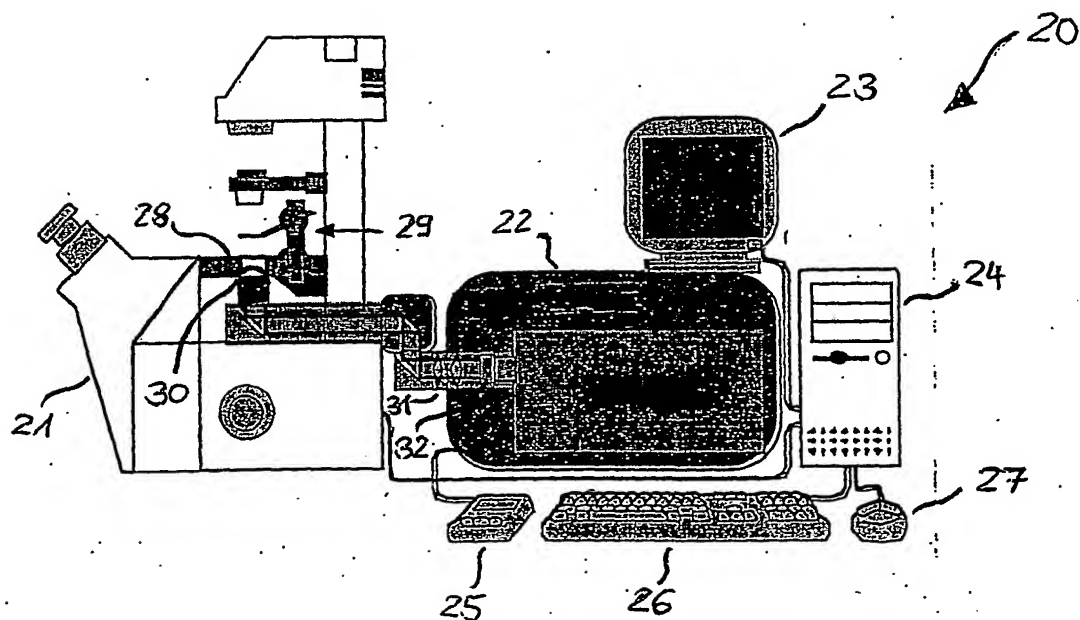


FIG. 4

BEST AVAILABLE COPY